


**GEM-DIPHOSPHONIC ANALOGUES OF AMETHOPTERIN AND OF  
DEAZA-N-10 AMETHOPTERIN****BEST AVAILABLE COPY**

**Patent number:** WO8806158  
**Publication date:** 1988-08-25  
**Inventor:** STURTZ GEORGES (FR); VOISIN  
PATRICIA (FR)  
**Applicant:** STURTZ GEORGES (FR)  
**Classification:**  
**- International:** C07F9/65; A61K31/675; C07F9/38;  
C07F9/40  
**- european:** C07F9/6561; C07F9/38A6U; C07F9/40A6U;  
C07F9/6509B4R  
**Application number:** WO1988FR00088 19880218  
**Priority number(s):** FR19870002449 19870220

**Also published as:** **FR2611203 (A1)****Cited documents:** **EP0186405**

Abstract not available for WO8806158

Abstract of corresponding document: **FR2611203**

New derivatives of general formula (1) in which: either X = (a), where R<1> = H, lower alkyls (C1 to C6) or X = (b), where R<1> = H, lower alkyls (C1 to C6), as well as their metallic salts and their addition salts with nitrogen-containing bases. These products are useful as anticancer agents, in particular in the treatment of bone tumours, and therapeutic agents in the treatment of certain rheumatic disorders.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

## GEM-DIPHOSPHONIC ANALOGUES OF AMETHOPTERIN AND OF DEAZA-N-10 AMETHOPTERIN

Description of corresponding document: FR2611203

La présente invention a pour objet la synthèse d'analogues gem-diphosphoniques d'améthoptérine (Methotrexate) et de déaza N-10 améthoptérine et leurs applications pharmacologiques.

Les composés diphosphoniques 1 a et 1 de l'invention répondent à la formule générale

EMI1.1

la

EMI1.2

avec R1 = H, alkyles inférieurs(C1 à C6 1.

1b:

EMI1.3

avec R1 = H, alkyles inférieurs(C1 à C6).

sous formes acides et sels pharmaceutiquement acceptables.

Le méthotrexate est un agent thérapeutique important.

A faibles doses, en administration fractionnée, il est désormais couramment utilisé dans le traitement de rhumatismes psoriasiques rebelles, des polymyosites, de la maladie de Reiter et plus récemment des polyarthrites rhumatoïdes. On a montré qu'il possède à la fois des propriétés immuno-dépressives et anti-inflammatoires bien que son mécanisme d'action dans ces affections ne soit pas connu de façon précise.

A fortes doses, son utilisation comme agent antinéoplasique est courante, notamment en ce qui concerne le traitement d'un certain nombre de tumeurs cancéreuses parmi lesquelles des tumeurs osseuses.

Cependant, l'intérêt comme agent anticancéreux du méthotrexate est sous la dépendance limitante des importants effets secondaires que son action entraîne sur l'ensemble de l'organisme.

La présente invention propose des analogues diphosphoniques du méthotrexate qui présentent en plus des propriétés déjà citées, Jr. tropisme osseux très favorable 2u ratio thérapeutique activité/toxicité qui confère à ces composés un grand intérêt notamment pour les carcinomes osseux.

Ces composés ont fait l'objet dans leur phase finale d'une approche synthétique différente et seront donc présentés séparément. Ils seront obtenus, in fine, sous forme de sels de sodium.

En ce qui concerne les composés la, leur obtention résulte de l'action sur les formes 2a - premièrement de la soude, - deuxièmement de l'action du bromure de triméthyl silyle suivie d'une méthanolyse.

EMI2.1

2a

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6).

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6).

R1 = H, alkyles inférieurs (D1 à C6).

Dans la présente invention, le noyau ptéridine des composés 2 est obtenu par condensation de la guanidine sur des pyrazines diphosphoniques intermédiaires 3a synthétisées suivant l'approche que Taylor et Kobayashi décrivent dans le journal of Organic Chemistry, 38, 2817 (1973).

EMI3.1

3a

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6)

EMI3.2

2a

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6).

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

L'étape précédente qui suivant l'invention permet d'obtenir les composés 3a, est une condensation à température ambiante en présence de carbonate de potassium en excès entre l' amino-2 bromométhyl-5 cyano-3 pyrazine dont la synthèse a été décrite par Taylor, Perlman, Sword, Sequin-Frey et Jacobi dans Journal of American Chemical Society, 95, 6407, (1973), et un dérivé N-((alkyl amino)-4 benzoyl) diphosphonoglutamique 4a de formule générale

EMI4.1

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6)

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

Ces dérivés 4a sont issus de la réaction suivant

Schotten-Baumann d'un acide p-N(alkylamino) benzoïque sur les dérivés diphosphoniques, synthons communs aux composés 1a et 1b de l'invention : les amino-2 bis dialkyl phosphono-4,4 butyrates d'alkyle 5.

EMI4.2

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

Le procédé de l'invention pour la préparation de composés de type 4a propose dans une première étape de protéger l'acide p-N(alkylamino) benzoïque par le trichloro-1,1,1 éthoxycarbonyl puis d'activer sa fonction acide par le chlorure de thionyle pour former intermédiairement les composés

EMI4.3

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6)

La deuxième étape permet, par condensation de composés de type 5 dilués dans un

mélange 50-50 d'une solution saturée de bicarbonate de sodium et d'acétate d'éthyle sur le chlorure d'acide N-protégé, d'obtenir après libération de la fonction amine par la poudre de zinc les dérivés de type 4a.

Les dérivés 1, comme les composés 2a, dérivent de leurs analogues esters diphosphoniques 2b.

Après une hydrolyse des esters phosphoniques par le bromure de triméthyl silyle suivie d'une méthanolyse et une hydrolyse de l'ester carboxylique par action de la soude EMI5.1

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6)

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6) En ce qui concerne les composés 2b ci-dessus, l'invention propose de les obtenir par une stratégie de synthèse totalement différente de celle utilisée pour les dérivés aza N-10 diphosphoniques de type a.

Le procédé de l'invention pour la préparation de composés déaza-10 aminoptérine repose en effet sur la condensation peptidique entre l'acide amino-4 désoxy-4 déaza-10 ptéroïque ou de ses dérivés alkylés en 10, dont les modes d'accès ont été décrits il y a plusieurs années, et les synthons diphosphoniques de formule générale 5. EMI6.1

R1 = H, alkyles inférieurs R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)  
(C1 à C6) R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

EMI6.2

condensation peptidique

EMI6.3

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6)

La littérature propose l'utilisation de différents agents de couplage pour réaliser ce type de condensation peptidique.

La méthode classique dite à "l'anhydride mixte" fait intervenir par exemple le chlorocarbonate d'isobutyle comme agent de couplage. La réaction a lieu, à température ambiante, en présence de triéthylamine dans le diméthylformamide.

L'invention utilise cette méthode de couplage et l'applique, avec le chlorocarbonate d'isobutyle, à la synthèse des dérivés analogues diphosphoniques déaza N-10 ou déaza N-10 alkyles N-10 du méthotrexate. Il est également possible d'utiliser toute méthode connue de l'homme de métier.

Sturtz et Guillaumet ont décrit dans "European Journal of medicinal chemistry", 217, (1984) la synthèse d'analogues phosphoniques de l'acide glutamique et leur application à la synthèse par exemple d'analogues phosphoniques du méthotrexate.

La présente invention propose la synthèse d'amino-2 bis dialkylphosphono-4,4 butyrates d'alkyle 5 par addition nucléophile de carbanion du N-benzylidène glycinate d'alkyle initialement décrit par Stork, Leong et Touzin dans Journal of Organic Chemistry, 41, 3491, (1976), sur les vinylidène diphosphonates de dialkyle-1,1 de formule générale 6 suivie d'une déprotection de la fonction amine en milieu HCl 0,5 N.

## EMI7.1

R = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

Outre leur intérêt dans la synthèse d'analogues phosphoniques du méthotrexate les composés de types 5 peuvent présenter des propriétés intrinsèques intéressantes.

Les formes acide 5a et sel de sodium 5b des composés 5 font également l'objet de la présente invention ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

Le composé 5a est obtenu par hydrolyse à l'acide chlorhydrique suivie d'une libération du chlorhydrate intermédiaire à l'oxyde de propylène. Le passage au sel de sodium 5b se fait par action de la soude 0,1 N.

## EMI8.1

## EMI8.2

R2 = alkyles inférieurs (C1 à 1) HCIR3 = alkyles inférieurs (C1 à 2) Oxyde de propylène

## EMI8.3

Dans l'invention, les vinylidène diphosphonates de dialkyle 6 sont issus d'une isomérisation d'Arbuzov entre un trialkyl phosphite et un bromo-1 vinylphosphonate de dialkyle lui-même obtenu à partir d'un vinylphosphonate de dialkyle suivant le mode opératoire utilisé par Belbeoc'h, Thèse Doctorat Sciences Physiques, Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Un certain nombre de tests biologiques ont été réalisés sur ces molécules par comparaison au Méthotrexate.

Ceux-ci montrent que - si l'activité inhibitrice sur la dihydrofolate réductase est environ 50 fois moins importante, - si la cytotoxicité est environ 2000 fois moins importante pour les cellules L1210 en culture, ces composés sont aussi actifs (à 30 mg/kg, voie orale) que le méthotrexate (à 15 mg/kg voie orale ou 50 mg/kg, voie intrapéritonéale) en traitement unique dans le modèle d'ostéosarcome murin.

Ils démontrent d'une manière incontestable la validité du concept de trophisme osseux et donc l'intérêt de ces produits pour les maladies osseuses.

Les exemples suivants illustrent l'application de ces synthèses à la préparation de dérivés analogues diphosphoniques du méthotrexate.

## EXEMPLE 1

SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 1a où R1 = CH3 a) Obtention du vinylidène diphosphonate de diéthyle (R3=C2H5)

Dans un tricol de 250 ml, muni d'une agitation magnétique et surmonté d'une ampoule isobare, d'un thermomètre à mercure et d'un appareillage de distillation, on place un mélange de 0,30 mole de chlorure de Nickel dans 0,39 mole de triéthylphosphite. Le mélange est

porté à 120°C à l'aide d'un bain d'huile. On additionne, alors goutte à goutte 0,39 mole de bromo-1 vinylphosphonate de diéthyle plus une

petite quantité d'hydroquinone. Il y a décoloration puis recoloration de la solution en même temps que le bromure d'éthyle distille. Le chauffage est maintenu pendant une heure après la fin de l'addition.

Après traitement, le produit est distillé au vide de la pompe.  
EMI10.1

$E_b 0,05 = 130$  CRdt w 45 Z

Spectre RMN : ( CDCl<sub>3</sub>)

Phosphore : #p = 13 ppm

Proton# : Ha = 1,33 ppm, t ; Hb = 4,25 ppm, m;

Hc = 6,98 ppm, qd. (JPHcis : 32,6 Hz

JPHtrans : 36,5 Hz).

b) Accès à l'amino-2 bis diéthylphosphono-4,4 butyrate d'éthyle

b. 1. Synthèse du produit N-protégé

Dans un tricol de 250 ml muni d'une agitation magnétique, on forme, sous atmosphère d'azote, une solution d'éthylate de sodium par addition de 9,10 3 mole de sodium dans 100 ml d'éthanol.

En contrôlant la température ( $T < 50^\circ\text{C}$ ) on additionne goutte à goutte 0,1 mole de glycinate d'éthyle- N-protégé pour en former le carbanion. Quand la température est aux environs de  $0^\circ\text{C}$  on ajoute 910'2 mole de bis(diéthylphosphono-1,1) vinylidène en maintenant la température inférieure à  $50^\circ\text{C}$ . L'agitation est maintenue deux jours à température ambiante. Un suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince. Le mélange est mené à un pH = 6-7 par addition d'une solution saturée de chlorure d'ammonium. Après évaporation du solvant puis extraction à l'éther, séchage, filtration et à nouveau évaporation, on obtient quantitativement le produit N-protégé.

EMI11.1

Spectre RMN : ( CDCl<sub>3</sub>)

Phosphore : #P = 21,97 ppm. Un pic dédoublé JP-P = 9,76 Hz.

b.2. Déprotection de la fonction amine

Le produit N-protégé récupéré à l'étape précédente est repris dans 250 ml d'une solution HCl 0,5 N et mis sous agitation entre  $0^\circ\text{C}$  et  $100^\circ\text{C}$  pendant deux heures. On extrait deux fois à l'éther afin d'éliminer le benzaldéhyde. A la phase aqueuse récupérée on additionne environ 300 ml d'une solution NaOH 0,5 N. Le pH passe ainsi de 1 à 11,5. Après extraction au chloroforme, on récupère la phase organique qui est séchée, filtrée puis évaporée. On récupère ainsi quantitativement un produit jaune huileux.

EMI12.1

Rdt - 86Z

Spectre RMN ( CDCl<sub>3</sub>)

Phosphore : #P = 23,52 ppm ; JP-P = 9,75 Hz doublet.

Proton s : : Ha+a' = 1,35 ppm, t Hc = 1,9 ppm, massif;

He : entre 2,3 et 3,5 ppm, massif ; Hf : en

tre 3,7 et 3,9 ppm, massif ; Hb+b' : entre

4 et 4,5 ppm, qb + t imbriqués ; Hd = 7,3 ppm,

massif.

**Carbone**  
**EMI12.2**

$Q = 16,10$  ppm ;  $C1' = 15,7$  ppm ;  $C6 = 32,2$  ppm, triplet,  
 $J_{P-C} = 133$  Hz ;  $C5 = 30,0$  ppm ;  $C4 = 52,175$  ppm, doublet,  
 $J = 3$  Hz ;  $C2 = 62,0$  ppm ;  $C2' = 61,9$  ppm ;  $C3 = 175$  ppm.

**b.3. Passage aux formes acide et sel - passage à la forme acide**

Dans un tricol de 100 ml, on place 10 gd'amino-2 bis diéthyl phosphono-4,4 butyrate d'éthyle et 40ml d'acide chlorhydrique concentré (12,4 N). Le mélange est porté au reflux de l'acide chlorhydrique pendant une nuit.

Après évaporation de l'acide chlorhydrique en excès, le résidu est repris à l'eau puis évaporé à nouveau. Le solide récupéré est repris dans un mélange eau + charbon actif.

Après filtration à chaud puis évaporation du solvant au rotavapor, on récupère après passage à l'étuve un produit cristallisé blanc qui correspond au chlorhydrate du composé recherché avec un rendement de 80 %.

**EMI13.1****- libération du chlorhydrate par l'oxyde de propylène**

On place 2,20 g de chlorhydrate précédent dans un tricol de 100 ml en solution dans 40 ml d'éthanol plus 1 ml d'HCl concentré pour obtenir la dissolution totale du produit. Le mélange est mis sous agitation magnétique et la température est abaissée à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Par une ampoule isobare, on additionne alors 15ml d'oxyde de propylène. Après quelques minutes d'agitation, on évapore le solvant pour récupérer un solide blanc que l'on recristallise dans un mélange eau-méthanol (1-3). Le produit, alors caractérisé par

RMN du phosphore:  $6P = 21,3$  ppm.

**- passage au trisél de sodium**

L'acide libéré de son chlorhydrate est repris dans de l'eau distillée et solubilisé à chaud. Un volume de solution aqueuse de NaOH 0,1 N correspondant à 3 équivalents est additionné. On passe ainsi d'un pH de 2 à un pH de 8,5.

Après évaporation de l'eau au rotavapor et passage du produit à l'étuve, on récupère un solide blanc avec un rendement de 90%.

**EMI14.1****Spectre RMN**

Phosphore (dans D<sub>2</sub>O) :  $\delta 21,02$  ppm, doublet,  $J_{p-p} = 10$  Hz.

Proton (dans D<sub>2</sub>O) :  $\delta_{Hb+Hc}$  : entre 2,8 et 2,4 ppm, multiplet,

;  $H_a = 4$  ppm, dd.

<sup>13</sup>C (dans D<sub>2</sub>O)

**EMI14.2**

$SC3 = 30,4$  ppm ;  $C1 = 40,7$  ppm, t,  $J_{C1-P} = 110$  Hz

$C2 = 58,1$  ppm, t  $J_{C2-P} = 6$  Hz ;  $C4 = 178,3$  ppm.

c) Condensation de l'aminobisdéthylphosphono-4,4 butyrate d'éthyle sur le chlorure de l'acidep-(N-(méthylamino)) benzoïque N-protégé

G.1. condensation suivant Schotten-Baumann

Dans un tricol de 1000 ml muni d'une agitation mécanique, d'un thermomètre à alcool, d'une ampoule isobare, on dispose sous atmosphère d'azote, 200 ml d'une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. On introduit ensuite l'ester aminophosphonique en solution dans l'acétate d'éthyle et on refroidit l'ensemble vers 0°C.

On additionne alors par l'ampoule isobare, le chlorure de l'acidep-(N-méthylaminobenzoyl) N-protégé en solution dans un mélange acétate d'éthyle-éther en maintenant une agitation vigoureuse.

Cette agitation est poursuivie pendant 4 heures à température ambiante. Par décantation, on isole la phase organique qui est successivement lavée à l'eau, à l'acide chlorhydrique 1N, puis de nouveau à l'eau. Après séchage sur sulfate de magnésium, les solvants sont éliminés au rotavapor et l'ester N-(p-(N-(trichloroéthoxycarbonyl) méthylamino) benzoyl) aminophosphonique isolé. La purification est obtenue par chromatographie sur colonne de gel de silice.

Solvants d'élution : Acétate d'éthyle pur puis acétate d'éthyle-éthanol (95-5).

EMI15.1

rendement = 60 % après chromatographie

Spectre RMN (CDCl<sub>3</sub>)

Phosphore: un pic à  $\delta$  23,4 ppm

Proton: aHa + a' = entre 1 et 1,5 ppm, t ; Hb = 3,4 ppm, s,

Hc+c' = entre 4 et 4,5 ppm, multiplet ; Hd = 4,75 ppm,

s ; He+e' = 7,4 ppm, doublet, 8,2 ppm, doublet, spec

tre AB : Hf = 7,6 ppm, s ; Hg = 8,6 ppm, dou

blet large.

Carbone 13

EMI15.2

C1+C1' = 13,5-15,8 ppm ; C3 = 32,2 ppm, t, JP-C3=130Hz ; C7

37,0 ppm ; C2+C2' = 59,6-62,5ppm ; C13 = 60,7-62,5 ppm, d ;

C5 = 94,7ppm ; C11 = 126,5 ppm ; C10 = 127,6 ppm ; C9 =

130,5ppm ; C8 = 152,6ppm ; C10 ; 165,9 ppm ; C12 = 170,5 ppm.

c.2. déprotection de la fonction amine

Dans un tricol de 100 ml, on met en présence 6 g de poudre de zinc en solution dans du tétrahydrofurane et une solution aqueuse de phosphate potassique monobasique de pH voisin de 4. Quand la température du mélange est inférieure à 50°C, on additionne goutte à goutte par une ampoule isobare, 7,3 mmole de produit à déprotéger.

La température est contrôlée au bain de glace pendant l'addition. L'agitation est maintenue pendant quelques heures à température ambiante.

Après filtration et évaporation du tétrahydrofurane, le résidu est repris dans un mélange



eau + chloroforme. Après décantation et extraction au chloroforme, la phase organique récupérée est séchée sur sulfate de magnésium puis le solvant évaporé. On récupère ainsi quantitativement le produit déprotégé.

EMI16.1

#### Spectre RMN ( CDCl<sub>3</sub> )

Phosphore : Spectre de type AB centré sur  $\delta = 23,67$  ppm 1 = 23,85 ; 2 = 23,79 ; 3 = 23,55 ; 4 = 23,49 ; J JPP = 2,44 Hz.

Proton : AHa+a' = 1,25, t ; Hf+Hg = entre 1,9 et 2,4 ppm, massif  
He = 2,5 ppm, t, mal résolu ; Hc = 2,85 ppm, s. Le déplacement chimique du N-CH<sub>3</sub> sort à champ plus fort par rapport au composé N-protégé ( $\delta = 3,4$  ppm) ; Hb+Hb' entre 3,3 et 4,4 ppm, multiplet ; Hh+h' : spectre de type AB centré sur 7,15 ppm.

#### d) Synthèse de la pyrazine ester diphosphonique

Dans un tricol de 100 ml, on place 2,510 mole de diphosphonate en solution dans 20 ml d'acétonitrile et 7,110 3 mole de carbonate de potassium. 2,5 10 3 moles d' amino-2 cyano-3 bromométhyl-5 pyrazine en solution dans 40 ml d'acétonitrile sont additionnées au mélange précédent à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant 48 heures. L'avancement de la réaction est suivi en chromatographie sur couche mince de gel de silice (solvant d'élution = acétate d'éthyle). L'acétonitrile est évaporé au rotavapor, le produit récupéré est alors remis en solution dans un mélange eau-chloroforme. Après décantation, on extrait au chloroforme, sèche la phase organique sur sulfate de sodium, filtre sur Büchner et enfin évapore le solvant. Le composé récupéré est alors purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (solvant d'élution = acétate d'éthyle - éthanol 95-5). Rfr- 0,18.

EMI17.1

#### Spectre RMN ( CDCl<sub>3</sub> )

Phosphore : Spectre de type AB centré sur  $\delta = 23,63$  ppm  
1 = 23,88 ppm : 2 = 23,79 ppm : 3 = 23,46 ppm : 4 = 23,37 ppm.

J P-P : 3,66 Hz Proton

EMI17.2

oHa+a' = 1,3 ppm, multiplet ; Hi+j = entre 2,1 et 3,1 ppm, multiplet, (3H) ; Hf = 3,1 ppm, s, (3H) ; Hb+b' = entre 4 et 4,4 ppm, multiplet ; Hk = 4,6 ppm, s ; Hh = 4,8 ppm, massif  
Hc = 5,5 ppm, s ; Hd+d' = 6,7 ppm, d 7,8 ppm, d, type AA'  
Bb' ; Hg = 7,3 ppm, s ; He = 8,1 ppm, s.

<sup>13</sup>C

EMI18.1

EMI18.2

<SEP> <sup>13</sup>C <SEP> # <SEP> <SEP> (ppm) <SEP> <sup>13</sup>C <SEP> a <SEP> (ppm)  
<b> <SEP> C16, <SEP> 13,8 <SEP> C2 <SEP> 111,8  
<b> <SEP> 15,98

1b> 16,28  
 1b> 121,09  
 1b> 128,8  
 1b> 143  
 1b> 144,8  
 1b> 150,85  
 1b> 155,47  
 1b> 167,07  
 1b> 171,28  
 1b>

Spectre infrarouge (v en cm)  
 EMI19.1

EMI19.2  
 (1250-12101 TF  
 EMI19.3

-C-N (2250)F ; -NH<sub>2</sub> (3350).

e) Formation du noyau ptéridique par condensation de la guanidine

Accès au composé 2a où R<sub>3</sub> = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> et R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>

Dans un tricol de 500 ml placé sous atmosphère d'azote et sous agitation magnétique, on place 12,5 10<sup>-3</sup> 3 mole de sodium métallique qu'on laisse se consommer dans 300ml d'éthanol. A ce mélange on additionne 12,45 10<sup>-3</sup> 3 mole de chlorhydrate de guanidine préalablement séché à l'étuve. On laisse décanter le NaCl au fond du tricol et on récupère le surnageant auquel on ajoute 410 3 mole de pyrazine ester diphosphonique. L'agitation est alors maintenue plusieurs jours à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un suivi par chromatographie sur couches minces de gel de silice peut être réalisé.

Après évaporation de l'éthanol au rotavapor, on récupère un solide jaune orangé.

Spectre RMN

Phosphore (DMSO) : #P = 20,21 ppm

Proton (DMSO)

EMI19.4

Ha : entre 1,15 et 1,30 ppm, multiplet ; Hf = 3,18 ppm, s ;  
 Hp : entre 3,7 et 4,3 ppm, multiplet ; Hh = 4,6 ppm, massif  
 Hd'd' = 6,84 ppm, d, 7,70 ppm, d, type AA'BB' ; Hg = 7,25  
 ppm, massif ; He = 8,31 ppm, s.

DMSO: dimethylsulfoxyde deutérié

Carbone 13 (DMSO)

EMI20.1

EMI20.2

13C <SEP> # <SEP> (ppm) <SEP> 13C <SEP> # <SEP> (ppm)

1b> <SEP> 16,93

1b> <SEP> C19 <SEP> # <SEP> <SEP> , <SEP> d, JP-C <SEP> 6,1 Hz <SEP> C6

<SEP> 145,9

<tb> 17,2

<tb> <SEP> C10 <SEP> 39,6 <SEP> C7 <SEP> 146,7

<tb> <SEP> C20-20' <SEP> 62,9 <SEP> C8a <SEP> 154,5

<tb> <SEP> C4a <SEP> 112,3 <SEP> C15 <SEP> 167,1

<tb> <SEP> C14 <SEP> C21 <SEP> 174,0

<tb> <SEP> 114,3 <SEP> ; <SEP> 122,2 <SEP> ;

<tb> C13 <SEP> 124,0 <SEP> ; <SEP> 130

<tb> <SEP> C12

<tb> f) Passage au composé où R1 = CH3

f.1. saponification de l'ester carboxylique

Le produit récupéré de l'étape précédente est repris dans l'éthanol et placé dans un tricol de 500ml sous atmosphère inerte d'azote et sous agitation magnétique.

On ajoute alors une quantité stoechiométrique d'une solution alcoolique de soude 1N. Le mélange est légèrement chauffé à 350C pendant une heure et demie, puis l'éthanol est évaporé. Le produit solide récupéré est repris dans de l'eau distillée puis acidifié jusqu'à pH = 3 par une solution d'HCl 0,2 N. Après évaporation de l'eau au rotavapor, on sèche le produit à l'étuve à vide.

f.2. hydrolyse des esters phosphoniques

Les fonctions esters phosphoniques sont silylées par le bromure de triméthylsilyle dans l'acétonitrile à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant 48 heures à l'abri de la lumière. Les esters silylés sont alors coupés par méthanolyse. le solvant est éliminé au rotavapor. Le produit solide récupéré est séché à l'étuve sur P205.

Spectre RMN

Phosphore (DMSO + ATFA) : aP = 25,61 - 25,34 ppm, d, JP-P = 11 Hz.

Proton (DMSO + ATFA)

EMI21.1

ô Hi+Hj : entre 1,9 et 2,8 ppm, multiplet ; Hf = 3,1 ppm, s

Hk+Hh = entre 4,5 et 5,1 ppm, massif ; Hd''d' = 7,83, d, 6,86, d

type AA'BB' : Hg = 7,3 ppm. massif ; He = 8,74 ppm. s.

13C (ATFA)

EMI21.2

ATFA: acide trifluoroacétique deutérié

EMI22.1

<tb> <SEP> 13C <SEP> a <SEP> (ppm) <SEP> 13C <SEP> a <SEP> (ppm)

<tb> <SEP> C16 <SEP> 29,7 <SEP> C11 <SEP> 151,2

<tb> <SEP> C10 <SEP> 35,3 <SEP> C15 <SEP> 170,1

<tb> <SEP> C9 <SEP> 52,9 <SEP> c21 <SEP> 176,1

<tb> C6-C7 <SEP> 144,4-143,7-143,2

<tb>

On note la disparition des pics correspondants aux déplacements des carbones des fonctions esters.

f.3. Passage au sel de sodium du composé a

On dissout partiellement le produit récupéré plus haut dans 20 ml de méthanol distillé puis on additionne 60ml d'une solution aqueuse de soude 1N. Après une nuit d'agitation à l'abri de la lumière on récupère après évaporation des solvants, un produit solide

jaune pâle. Lapurification finale est effectuée par chromatographie liquide à haute performance sur une matière absorbante à phase inversée (JOBIN-YVON - Phase nucléosil C18,  $\lambda = 290$  nm).

#### Spectre RMN

Phosphore (dans D<sub>2</sub>O) : un pic dédoublé  $\delta 1 = 22,0$  ppm  
 $\delta 2 = 22,37$  ppm JP-P = 14,6 Hz.

#### EXEMPLE 2

SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 1 ou R1 = H a) Synthèse de l'acide amino-4 désoxy-4 déaza-4 ptéroïque b) formation du noyau ptéridine : obtention du composé 2

où R1=H, R2 = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> et R3= C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

b.1. synthèse de l'acido-2 bis diéthylphosphono-4,4 butyrate d'éthyle.

reprise de la méthode utilisée en c) de l'exemple 1.

b. 2. synthèse du composé 2b. Couplage peptidique par la méthode "à l'anhydride mixte".

Dans un tricol de 250ml muni d'une agitation magnétique, on place 1,24 g ( $4 \cdot 10^{-3}$  mole) d'acide déaza ptéroïque, 1,75 ml de triéthylamine fraîchement distillée et 100ml de DMF sec.

Sous atmosphère inerte d'azote, on additionne dans un premier temps, 0,52 ml ( $4 \cdot 10^{-3}$  mole) d'isobutylchloroformate. Il se forme alors l'anhydride mixte.

Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, on ajoute 1,61 g d'amino ester ( $8 \cdot 10^{-3}$  mole) et une minute plus tard à nouveau 0,26 ml ( $2 \cdot 10^{-3}$  mole) d'isobutylchloroformate.

Au bout de 15 minutes 0,80 g d'ester sont additionnés, suivis de 0,13ml d'isobutylchloroformate.

Après un délai de 15 minutes, on ajoute à nouveau 0,40 g d'ester puis une minute plus tard 0,13 ml d'isobutylchloroformate.

0,40 g d'ester sont finalement additionnés au bout d'un quart d'heure.

#### - Spectre RMN

Proton (DMSO d<sub>6</sub>)

EMI24.1

a Ha = 1,18, t; Hh+i+d+c : entre 2,87 et 3,13 ppm, multiplet

Hb : entre 3,8 et 4,25 ppm, multiplet ; Hj = 6,84 ppm, mas

sif ; Hd'd" = spectre de type AB, 7,33 ppm, d, 7,81 ppm, d

Hg = 7,7 ppm, slarqe, He = 8,57 ppm, s.

<sup>31</sup>P (DMSO d<sub>6</sub>) :  $\delta = 27,9$  ppm.

<sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>)

EMI24.2

EMI24.3

<SEP> 13c <SEP> #.(ppm) <SEP> <SEP> 13c <SEP> #.(ppm)

<tb> <SEP> 17-17t <SEP> 15,2 <SEP> 14

<tb> <SEP> 17,0 <SEP> 122,4

<tb> <SEP> 9 <SEP> 46,7 <SEP> 13 <SEP> 128,4-129,5

<tb> <SEP> 12

<tb> <SEP> 16-16' <SEP> 6-7 <SEP> 146

<tb> <SEP> 63,3

<tb> <SEP> 15 <SEP> 162,6-163,7

<tb> c) passage au composé 16 b

c.1. libération des esters phosphoniques

2,4 g d'ester sont placés en solution dans 20ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en présence de 3,64ml de bromure de triméthylsilyle (8 équivalents)

L'agitation est maintenue à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 15 heures.

Après évaporation du chlorure de méthylène, on récupère un solide jaune clair que l'on traite par 20ml de méthanol. Puis on évapore le méthanol pour obtenir un produit solide orangé.

c.2. libération de l'ester carboxylique

Le produit intermédiaire récupéré précédemment est traité par une solution de soude dans un mélange eau méthanol (25-75) pendant plusieurs jours. Après évaporation des solvants et reprise en milieu aqueux, on contrôle le pH qui ne doit pas être supérieur à 8. L'eau est alors évaporée et on récupère 0,92 g d'un produit solide jaune pâle. La purification finale du composé 7 b est effectuée par chromatographie liquide à haute performance sur une matière absorbante en phase inversée.

spectre RMN phosphore (  $\text{D}_2\text{O}$  )  $\text{SP} = 23,5$  ppm

Expérimentations biologiques

Dix lots de souris C3H femelles greffés au jour Jo par l'ostéo- sarcome ostéogénique de la souris C3H, en sous-cutané sont traités (traitement unique) au jour J1 en administrant du méthotrexate ou à des fins comparatives du dérivé gem diphosphonique du méthotrexate.

L'activité anticancéreuse du dérivé gem-diphosphonique du méthotrexate a été évaluée par rapport au méthotrexate sur la base de l'évolution de la croissance tumorale par mesure du rap

EMI26.1

<tb> port <SEP> T/C <SEP> = <SEP> volume <SEP> tumoral <SEP> moyen <SEP> traité <SEP> x <SEP> 100.

<tb> <SEP> volume <SEP> tumoral <SEP> moyen <SEP> contrôle

<tb>

La toxicité des diverses doses a été évaluée d'après l'étendue de la perte de poids # p entre le premier et le cinquième jour (de J1 à J5).

Les résultats représentatifs obtenus sont les suivants

EMI26.2

<tb> <SEP> toxicité <SEP> activité <SEP> T/C <SEP> (%)

<tb> <SEP> traitement <SEP> (à <SEP> J1)

<tb> <SEP> méthotrexate

<tb> <SEP> 7,5 <SEP> mg/kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 2,4 <SEP> 110 <SEP> 115  
<SEP> 122  
<tb> <SEP> méthotrex <SEP> ate <SEP>  
<tb> <SEP> 15 <SEP> Mg/ <SEP> Kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 3,1 <SEP> 69  
<SEP> 83 <SEP> 88  
<tb> <SEP> méthotrex <SEP> ate <SEP>  
<tb> <SEP> 15 <SEP> mg/kg <SEP> SC <SEP> - <SEP> 1,6 <SEP> 123 <SEP> 123  
<SEP> 138  
<tb> <SEP> la <SEP> 3,75 <SEP> mg/kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 0,7 <SEP> 297  
<SEP> 131 <SEP> 138  
<tb> <SEP> 1a <SEP> 7,5 <SEP> mg/kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 0,9 <SEP> 169  
<SEP> 106 <SEP> 114  
<tb> <SEP> 1a <SEP> 15 <SEP> mg/kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 0,1 <SEP> 73  
<SEP> 76 <SEP> 101  
<tb> <SEP> 1 <SEP> a <SEP> 30 <SEP> mg/kg <SEP> VO <SEP> - <SEP> 0,2  
<SEP> 100 <SEP> 64 <SEP> 66  
<tb>

VO : voie orale - SC : sous cutanée - P : intrapéritonéale

Il ressort des résultats donnés ci-dessus qu'aucune toxicité particulière n'existe chez les animaux traités par le dérivé analogue gem diphosphonique du méthotrexate. D'autre part il existe un ralentissement tardif et prolongé de la croissance tumorale (J30-J37) pour le dérivé diphosphonique (30 mg/kg VO).

- Il apparait que l'activité de ces dérivés est fonction de la dose administrée.

D'autres tests biologiques similaires montrent que ces composés analogues gem diphosphoniques d'améthoptérine ont une activité 30 mg/kg VO (en traitement unique) comparable à celle du méthotrexate 15 mg/kg VO et 50 mg/kg IP (traitements uniques).

Attendu que le méthotrexate est considéré comme efficace, on peut s'attendre à ce que ces dérivés analogues gem diphosphoniques soient au moins aussi efficaces que le méthotrexate dans des conditions similaires.

L'activité anticancéreuse des dérivés analogues gem diphosphoniques du méthotrexate ressort de ces résultats d'essais.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

# GEM-DIPHOSPHONIC ANALOGUES OF AMETHOPTERIN AND OF DEAZA-N-10 AMETHOPTERIN

Claims of corresponding document: FR2611203

## REVENDICATIONS

1) Composés gem-diphosphoniques analogues d'améthoptérine (Methotrexate) et de déaza N-10 améthoptérine répondant à la formule générale

EMI28.1

EMI28.2

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6) avec R1 = H, alkyles inférieurs (C1 à C6).

R2 = alkyles inférieurs (C1 à C6)

R3 = alkyles inférieurs (C1 à C6),

ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

2) Composés selon la revendication 1 dans lesquels X signifie

EMI28.3

ou -CH2- ainsi que leur sels pharmaceutiquement acceptables.

3) Procédé pour l'obtention des composés selon l'une des revendications 1 ou 2 dans lequel on effectue les étapes suivantes a) addition nucléophile de carbanions de N-benzylidène glycinate d'alkyle sur les vinylidène diphosphonates de dialkyle-1,1,6 pour obtenir les amino-2 bis dialkyle phosphono-4,4 butyrates d'alkyle de formule générale 5 après une hydrolyse en milieu HCl 0,5 N.

b) Condensation des composés de type 5 sur les chlorures d'acides para-N(alkylamino) benzoïques protégés par le trichloro-1,1,1 ethoxycarbonyl pour obtenir les composés de type 4a après déprotection de la fonction amine.

c) Condensation des composés de type 4a sur l'amino-2 bromométhyl-5 cyano-3 pyrazine pour obtenir les pyrazines diphosphoniques 3a.

d) Condensation des pyrazines diphosphoniques 3a avec la guanidine pour obtenir les dérivés 2a.

e) Saponification de ces dérivés suivie de l'action du bromure de triméthyl silyle et d'une méthanolyse pour obtenir les formes acides i a f) Formation de tout sel correspondant pharmaceutiquement acceptable.

g) Pour la synthèse des dérivés 11a condensation de l'acide amino-4 desoxy-4 déaza-10 ptéroïque par la méthode de l'anhydride mixte.

4) A titre de composés intermédiaires utilisés dans le procédé-dessus a) les dérivés gem-diphosphoniques nouveaux de formule générale 5

## EMI29.1

R2=alkyles inférieurs(C1àC6) ; R3= alkyles inférieurs (C1à C6) ainsi que l'acide5a et les sels pharmaceutiquement acceptables (p.e 5b pour le sel de sodium).

## EMI29.2

R2= alkyles inférieurs(C1àC

R3= alkyles inférieurs(C1àC6)

## EMI30.1

R3= alkyles inférieurs ( C1àC6)

R3=alkyles inférieurs (C1àC6)

## EMI30.2

R2=a kyles inférieurs ( C à C

R = alkyles inférieurs ( C1 à C6 1 6) e)

## EMI30.3

2b R2 = alkyles inférieurs ( C1à C6)

R3 = alkyles inférieurs ( C1à C6) 5) Composition pharmaceutique destinée plus particulièrement au traitement des tumeurs osseuses mais également en rhumatologie au traitement par exemples de rhumatismespsoriasiques rebelles, de polymyosites, de la maladie de Reiter et de polyarthritesrhumatoides.

6) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient comme ingrédient actif, au moins un produit selon la revendication 1 ou un de ses sels, en association avec un adjuvant ou un enrobage pharmaceutiquement acceptable.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**